

亲和介质及溶液条件对蛋白质溶液中内毒素去除的影响

邢海新^{1,2}, 黄永东^{2,3}, 李岩², 罗坚², 张丽叶¹, 马光辉², 苏志国²

1 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

2 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100190

3 中国科学院过程工程研究所 国家生化工程技术研究中心, 北京 100190

摘要: 生物制品中内毒素的去除是一项十分重要的工作。为了更好地去除各种生物制品中的内毒素, 采用合成的多粘菌素 B 琼脂糖亲和介质, 通过静态吸附的方法去除蛋白质溶液中的内毒素。重点考察了介质的间臂长度、配基密度以及各种溶液条件 (pH 值、盐种类和浓度、蛋白质种类和浓度、内毒素浓度、添加剂等) 对内毒素去除率及蛋白质回收率的影响。分别采用动态浊度法和 Lowry 法检测内毒素含量和蛋白质浓度。结果表明该介质具有载量高、去除速度快、去除率高、可重复使用的特点。此外, 配基密度、pH 值、盐浓度和蛋白质特性 (等电点和疏水性) 对内毒素去除效果均有重要影响。在优化的条件下, 血红蛋白、人血清白蛋白和溶菌酶的回收率分别达到 87.2%、73.4% 和 97.3%, 相应的内毒素去除率分别达到 99.8%、97.9% 和 99.7%。阐明了各种因素对内毒素去除率和蛋白质回收率的影响规律, 为生物制品中内毒素的高效去除提供了参考。

关键词: 多粘菌素 B, 亲和介质, 内毒素, 溶液条件, 去除率, 回收率

Effect of affinity medium and solution conditions on endotoxin removal from protein solutions

Haixin Xing^{1,2}, Yongdong Huang^{2,3}, Yan Li², Jian Luo², Liye Zhang¹, Guanghui Ma², and Zhiguo Su²

1 College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

2 National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

3 National Engineering Research Centre for Biotechnology, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: Endotoxin removal is essential for the safety of biological products. To remove endotoxin efficiently, we used polymyxin B (PMB) affinity adsorbent to remove endotoxin from protein solutions by static adsorption. We studied the effects of spacer length and ligand density of the affinity adsorbent, pH, salt type and concentration, protein type and concentration, endotoxin concentration, and additive on endotoxin removal and protein recovery. Endotoxin content and protein concentration were determined by test and Lowry assay respectively. The results showed that PMB affinity adsorbent had high capacity, high adsorption speed, high removal efficiency and good reusability. In addition, ligand density, pH, salt concentration and the isoelectric point and hydrophobicity of protein all had remarkable influence on the endotoxin removal. Under the optimal conditions, the recoveries of hemoglobin, human serum albumin and lysozyme were 87.2%, 73.4% and 97.3%, respectively, and the corresponding endotoxin removal rates 99.8%,

Received: March 18, 2010; **Accepted:** May 17, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 20906094), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA100506).

Corresponding author: Yongdong Huang. Tel: +86-10-62561817; Fax: +86-10-62561813; E-mail: ydhuang@home.ipe.ac.cn
Zhiguo Su. E-mail: zgsu@home.ipe.ac.cn

国家自然科学基金项目 (No. 20906094), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA100506) 资助。

97.9% and 99.7%, respectively. This study illustrated the effects of solution conditions on the efficiency of endotoxin removal and protein recovery, and would provide useful reference for the efficient removal of endotoxin from biological products.

Keywords: polymyxin B, affinity adsorbent, endotoxin, solution conditions, removal efficiency, recovery

热原 (Pyrogen) 泛指能引起哺乳类动物发烧反应的物质, 种类很多, 其中最主要的是内毒素 (Endotoxin)。内毒素是一种脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS), 是革兰氏阴性菌的细胞壁外壁层上特有的结构, 细菌死亡或分解后被释放出来。在生物技术产业中, 革兰氏阴性菌被广泛地应用于生物制品 (如多肽和蛋白质) 的生产, 这些产品中经常会含有大量的内毒素。此外, 即使起始样品本身不含内毒素, 也可能由于环境或操作过程而受到热原污染。内毒素对生物体 (包括人体) 有着不可忽视的危害。少量的内毒素 (2 ng/kg 体重) 静脉注射就可以引起发烧、腹泻等反应, 大剂量时可引起血液循环障碍和内毒素休克^[1]。各国对生物制品的内毒素含量都有严格的要求, 一般规定每剂注射用针剂的内毒素含量必须低于 5 EU/kg 体重^[2-3]。因此, 生物制品中内毒素的去除一直是一项十分重要的工作。

内毒素主要由类脂 A (lipid A)、核心寡糖 (core oligosaccharide) 和 O-特异性多糖 (O-specific polysaccharide, O-antigen) 三部分组成^[4]。内层 (类脂 A) 和 中层 (核心寡糖) 含有大量的磷酸基和羧基, 因此内毒素的等电点较低 (约 3.1), 在通常 pH 条件下带负电荷。内毒素的特异性多糖区是亲水的, 而类脂 A 区是疏水的, 结构上类似表面活性剂。内毒素具有化学异源性, 不同来源的内毒素的分子量从几千到几万不等, 且内毒素的两亲性使其易在水溶液中形成分子量高达 40 万至 100 万不等的聚集体、胶束或胶囊^[4]。正是由于内毒素的性质极不均一, 人们很难找到一种简单或通用的去除方法。更令人头疼的是, 带负电荷的内毒素还可以和带正电荷的碱性蛋白结合, 也可以通过二价阳离子 (如 Ca^{2+} 等) 的桥接作用和酸性蛋白形成复合体, 类脂 A 的疏水特性也可导致内毒素和疏水性蛋白结合, 给热原的去除和目标蛋白的回收工作带来严峻挑战。迄今为止, 相分离^[5-6]、超滤^[7-8]、凝胶过滤^[9-10]、离子交换^[10-12]、疏水层析^[10,13-14]都已用于蛋白质溶

液中内毒素的去除, 但上述方法通常存在选择性差、内毒素去除率低和目标蛋白回收率低等问题。

亲和层析具有高度的选择性, 是去除内毒素的一种较为理想的方法。自 20 世纪 80 年代起, 组胺、组氨酸、脱氧胆酸、聚阳离子 (聚 L-赖氨酸, PLL; 聚乙基亚胺, PEI)、多粘菌素 B (PMB) 等^[15-16]就被用作配基制备亲和介质用于从牛血清白蛋白、溶菌酶、质粒 DNA 中去除内毒素^[17-18]。其中 PMB 用于内毒素的去除已引起广泛的关注。Issekutz 等^[19]采用溴化氰活化法制备 PMB 亲和介质用于水溶液中内毒素的去除, 可以达到 99% 以上的去除率; 邹汉法等^[20]用 PMB 柱层析去除水溶液中内毒素, 去除率达到 90% 以上。与水溶液中内毒素的去除相比, 蛋白质溶液中内毒素的去除更加复杂, 不仅内毒素去除率出现不同程度的下降, 而且存在严重的蛋白质损失 (20%~50%) 现象^[17-18,21-22]。在内毒素去除过程中, 蛋白质回收率的高低不仅与蛋白质的性质有关, 还与介质性质及溶液环境有关, 而以往的研究^[17-18,21-22]只探索了 PMB 亲和介质用于蛋白质溶液中内毒素去除的可行性, 并未对上述各因素及其影响规律进行系统的考察。此外, 内毒素和许多蛋白质之间存在明显的相互作用^[5,7,23-24], 加大了内毒素去除的难度。

要掌握蛋白质溶液中内毒素的去除规律, 必须进行介质、蛋白质、溶液环境等多种因素之间相互作用的系统研究, 为此本实验首先合成了不同间臂长度和配基密度的 PMB 亲和介质, 并选取对内毒素去除具有重要影响的 4 个关键因素 (介质种类、pH 值、NaCl 浓度及蛋白质种类) 进行四因素四水平的正交实验。在此基础上, 针对不同蛋白质体系进行 pH 值、NaCl 浓度等主要影响因素的考察, 阐明各个因素的影响规律。此外, 还考察了对内毒素去除具有一定影响的其他操作条件 (如温度、时间及初始内毒素浓度等)。通过系统的研究, 从中发现了一些规律。在优化的条件下, 采用多粘菌素 B 亲和介

质可以实现不同蛋白质体系(血红蛋白、人血清白蛋白和溶菌酶)中内毒素的高效去除和目标蛋白质的高效回收,为生物制品中内毒素的高效去除研究提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 药品、试剂材料与仪器

内毒素 L4524 (Sigma); 内毒素标准品 (中国药品生物制品检定所); 鲎试剂 (广东湛江安度斯生物有限公司); 血红蛋白 Hb (Sigma); 人血清白蛋白 HSA (Sigma); 溶菌酶 LYS (Sigma); 多粘菌素 B 硫酸盐 (Sigma); 琼脂糖凝胶 QZT 4FF (国家生化工程技术研究中心, 北京); 其他试剂均为分析纯。

垂直混合仪 SB3 (Barloworld Scientific, 英国); 离心机 PMC-880 (TOMY KOGYO, 日本); 真空泵 SHZ-D (河南省巩义市英岭生化仪器厂); 摇床 HZS-H (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)。

所有玻璃器皿洗净后 210℃ 下干热灭菌 3 h。

1.2 实验方法

1.2.1 亲和介质制备

琼脂糖凝胶经不同的环氧活化试剂(环氧氯丙烷和 1,4-丁二醇二缩水甘油醚)活化后,直接偶联 PMB 亲和配基,得到去除内毒素的 PMB QZT FF 亲和介质。

1.2.2 内毒素储备液配制

准确称取内毒素 (L4524) 1 mg, 用 1 mL 无热原注射用水溶解, 配制成 1 mg/mL (4 177 700 EU/mL) 的内毒素储备液, 使用时用相应的缓冲液稀释至目标浓度。

1.2.3 蛋白储备液配制

血红蛋白储备液: 准确称取 100 mg 血红蛋白 (Hb), 用 20 mL 无热原注射用水溶解, 配制成 5 mg/mL 的蛋白质储备液, 使用时用相应的缓冲液稀释至目标浓度。

人血清白蛋白储备液和溶菌酶储备液配制方法同上。

1.2.4 内毒素吸附

在 GMP 车间中采用静态吸附法进行内毒素吸附实验。取出保存于 20% 乙醇中的 PMB QZT FF 亲

和介质, 放置于 G3 砂芯漏斗中, 分别用无热原注射用水、20 mmol/L PB (含 1% (W/V) 脱氧胆酸钠, pH 7.0)、无热原注射用水充分淋洗, 用真空泵抽干, 去除亲和介质中的内毒素。准确称取 100 mg 亲和介质, 转移至 5 mL 西林瓶中, 加入 2 mL 相应样品 (2 mL 内毒素溶液、或 2 mL 蛋白质溶液、或 2 mL 内毒素和蛋白质的混合溶液), 密封后放入摇床中, 120 r/min、相应温度下吸附相应时间, 然后离心取上清测定其内毒素含量和蛋白质浓度。使用过的介质分别用无热原注射用水、20 mmol/L PB (含 1% 脱氧胆酸钠, pH 7.0)、无热原注射用水充分淋洗, 抽干备用或保存于 20% 乙醇中。

在正交实验中, 考察的各因素各水平分别为:

1) 介质种类: 3C-M (间隔臂为 3C 中等配基密度)、10C-M (间隔臂为 10C 中等配基密度)、10C-L (间隔臂为 10C 低配基密度)、10C-H (间隔臂为 10C 高配基密度); 2) pH 值: 5 (20 mmol/L HAC-NaAC)、7 (20 mmol/L PB)、8 (20 mmol/L PB)、9 (20 mmol/L Tris-HCl); 3) NaCl 浓度: 0、0.15、0.5、1.0 mol/L; 4) 蛋白质种类: 不含蛋白质、血红蛋白 (0.518 mg/mL)、人血清白蛋白 (0.464 mg/mL)、溶菌酶 (0.738 mg/mL)。样品中 LPS 浓度为 779.18 EU/mL, 吸附温度为 4℃, 时间为 0.5 h。

在正交实验的基础上, 又分别考察了 pH 值 (5~9)、NaCl 浓度 (0~1.0 mol/L)、CaCl₂ 浓度 (0~0.2 mol/L) 对不同体系中内毒素去除及蛋白质回收的影响。

实验还考察了其他操作条件例如温度 (4℃、25℃、37℃)、时间 (2 min~24 h)、初始内毒素浓度 (8.3554~41 777.0 EU/mL)、蛋白质浓度 (0~2.0 mg/mL)、添加剂 (EDTA、Triton X-100、脱氧胆酸钠、SDS 及尿素)、介质使用次数对内毒素去除的影响。

1.3 分析方法

1.3.1 内毒素检测

动态浊度法: 参照《中国药典 2005 年版第三部》附录中 XI E 中的动态浊度法^[25]。

内毒素去除率 = (吸附前样品中内毒素的量 - 吸附后样品中内毒素的量) / 吸附前样品中内毒素的量 × 100%。

1.3.2 蛋白浓度检测

Lowry 法: 参照《中国药典 2005 年版第三部》附录中 VI B 中的 Lowry 法^[25]。

蛋白回收率=(吸附前样品中蛋白的量-吸附后样品中蛋白的量)/吸附前样品中蛋白的量×100%。

2 结果与讨论

2.1 不同间隔臂长度和配基密度亲和介质的制备

在亲和介质制备过程中, 通过采用不同的环氧活化试剂和控制亲和配基的加入量, 得到不同间隔臂长度 (3C 和 10C) 和配基密度 (2.5、5.0 和 7.5 mg/mL, L、M 和 H) 的 PMB 亲和介质 (表 1)。

表 1 亲和介质的性能参数

Table 1 Parameters of affinity adsorbent

No.	Spacer arm	Ligand density (mg/mL)	Symbol
1	3C	5.0	3C-M
2	10C	5.0	10C-M
3	10C	2.5	10C-L
4	10C	7.5	10C-H

2.2 正交实验

首先通过四因素四水平的正交实验考察了 4 个关键因素 (介质种类、pH 值、NaCl 浓度和蛋白质种类) 对内毒素去除率和蛋白质回收率的影响, 结果如表 2 和图 1 所示。

表 2 正交实验结果

Table 2 Orthogonal experiment results

Experiment No.	Factor				Target		
	A Adsorbent	B pH	C NaCl concentration mol/L	D Protein	Endotoxin remained (EU/mL)	Endotoxin removal efficiency (%)	Protein recovery (%)
1	3C-M	5	0	None	20.58	97.36	
2	3C-M	7	0.15	Hb	0.02	99.997	66.39
3	3C-M	8	0.50	HSA	2.46	99.68	83.01
4	3C-M	9	1.00	LYS	0.07	99.99	81.73
5	10C-M	5	0.15	HSA	7.51	99.04	76.36
6	10C-M	7	0	LYS	15.21	98.05	77.24
7	10C-M	8	1.00	None	1.62	99.79	
8	10C-M	9	0.50	Hb	2.48	99.68	88.79
9	10C-L	5	0.50	LYS	283.73	63.58	81.14
10	10C-L	7	1.00	HSA	3.82	99.51	97.68
11	10C-L	8	0	Hb	0.42	99.94	69.06
12	10C-L	9	0.15	None	1.46	99.81	
13	10C-H	5	1.00	Hb	19.57	97.49	54.74
14	10C-H	7	0.50	None	2.20	99.72	
15	10C-H	8	0.15	LYS	1.22	99.84	82.49
16	10C-H	9	0	HSA	422.00	45.84	2.34
	Results analysis						
Mean endotoxin removal efficiency (%)	k1	99.26	89.37	85.30	99.17		
	k2	99.14	99.32	99.67	99.28		
	k3	90.71	99.81	90.66	86.02		
	k4	85.72	86.33	99.20	90.36		
Max difference	R	13.53	13.48	14.37	13.26		
Mean protein recovery (%)	k1	77.04	70.75	49.55			
	k2	80.80	80.44	75.08	69.74		
	k3	82.63	78.19	84.31	64.85		
	k4	46.52	57.62	78.05	80.65		
Max difference	R	36.10	22.82	34.77	15.80		

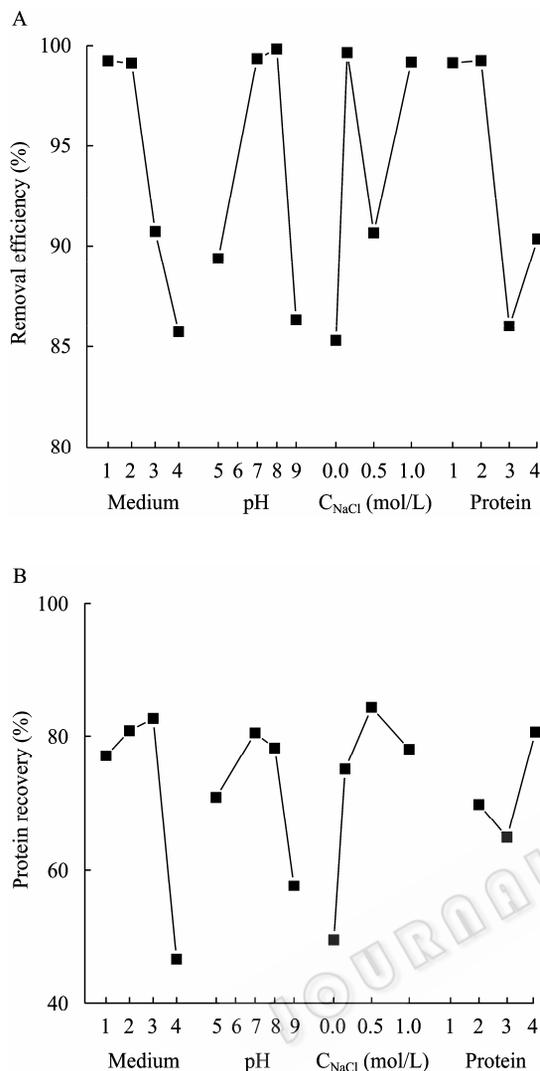


图1 正交实验结果图

Fig. 1 Orthogonal experiment results. (A) Endotoxin removal efficiency. (B) Protein recovery. Medium 1: 3C-M, 2: 10C-M, 3: 10C-L, 4: 10C-H; Protein 1: no protein, 2: Hb, 3: HSA, 4: LYS.

从蛋白质回收率指标来看, 介质种类和 NaCl 浓度影响极其显著, pH 值的影响次之, 蛋白质种类的影响最小; 从内毒素去除率指标来看, 4 个因素的影响基本相当, 但影响程度不如对蛋白质回收率的影响显著。综合考虑蛋白质回收率和内毒素去除率, 10C-M 介质 (3#, 10C 间臂, 中等配基密度) 最适合用于蛋白质溶液中内毒素的去除。随着 pH 的升高, 内毒素去除率和蛋白质回收率均呈现先升后降的变化趋势, 在 pH 7~8 的条件下效果最好。随着 NaCl 浓度的升高, 蛋白质回收率呈现先升后降的变化趋势, 但内毒素去除率呈现先升后降然后再上升

的复杂变化趋势。从蛋白质回收率的数据可以看出, 碱性、弱疏水性蛋白 (LYS) 最有利于蛋白质的回收, 中性、强疏水性蛋白 (Hb) 次之, 而酸性、中等疏水性蛋白 (HSA) 的损失最大, 回收率最低。此外, HSA 和 LYS 的加入导致内毒素去除率出现明显下降, 而 Hb 的加入对内毒素去除无明显影响。

2.3 溶液环境对不同体系中内毒素去除的影响

通过正交实验, 筛选出了适合蛋白质溶液中内毒素去除的亲介质 (10C-M 介质), 初步揭示了 pH 值和 NaCl 浓度对内毒素去除率和蛋白质回收率的影响趋势, 但其具体的影响规律和作用机理还有待于通过单因素条件考察实验来阐明。此外, 如何调节溶液环境来抑制不同蛋白质在亲介质上的非特异性吸附, 在确保内毒素高效去除的前提下进一步提高蛋白质的回收率还有待于解决。因此, 有必要通过单因素实验继续考察溶液环境 (pH 值、NaCl 浓度、二价阳离子 Ca²⁺等) 对不同蛋白体系中内毒素的去除和蛋白质回收的影响规律。鉴于 10C-M 介质性能最佳, 在后续的实验中都选用该介质。实验首先对水溶液和 Hb 溶液中内毒素的去除进行了考察。

2.3.1 pH 值的影响

分别考察了不同 pH 值 (5~9) 对不同体系 (水溶液和 Hb 溶液) 中内毒素去除的影响 (LPS 浓度为 835.54 EU/mL, Hb 浓度为 0.51785 mg/mL, 缓冲体系分别为 20 mmol/L HAC-NaAC (pH 5.0)、20 mmol/L PB (pH 6.0)、20 mmol/L PB (pH 7.0)、20 mmol/L PB (pH 8.0) 和 20 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 吸附温度为 4℃, 吸附时间为 0.5 h), 同时进行了单一的 Hb 体系的实验 (不添加内毒素), 以便考察亲介质对 Hb 的非特异性吸附, 结果如图 2 所示。

对于单一的 LPS 体系, 当 pH 值从 5.0 增加到 8.0 时, 内毒素去除率从 98.12% 逐步升高到 99.97%, 对应内毒素残留量从 15.72 EU/mL 降低至 0.22 EU/mL; 当 pH 值进一步增加到 9.0 时, 内毒素去除率有所下降 (99.78%), 对应内毒素浓度有所升高 (1.80 EU/mL)。上述变化趋势与文献报道的相似^[20], 但去除率有了进一步提高。文献中报道用 10 mg 的亲介质对应吸附 16 EU 的内毒素, 去除率为 92%^[20],

本研究用 100 mg 的亲和介质对应吸附 1671.08 EU 的内毒素, 在 pH 6~9 的范围内, 内毒素去除率均能达到 99.69% 以上, 对应浓度均能降至 2.62 EU/mL 以下。内毒素和亲和配基 PMB 之间的作用主要是疏水作用和静电作用。在低 pH 值 (如 5.0) 条件下, 内毒素分子中的磷酸基和羧基离子化程度较小, 可能导致内毒素与 PMB 配基之间的静电作用强度降低。此外, pH 的变化还可能影响内毒素和 PMB 配基的分子结构, 并影响它们之间的疏水作用。对于含 Hb 的内毒素体系, 其去除率略低于不含 Hb 的体系, 但其变化趋势与不含 Hb 的体系正好相反, 说明 Hb 的存在对内毒素的去除具有明显的影响。

对于含内毒素的 Hb 体系 (图 2 b), 在所考察的 pH 范围内, Hb 均有不同程度的损失。随着 pH 值从 5.0 逐步升高到 9.0, Hb 的回收率先逐步增加后降低, 在 pH 7.0 时达到极值 68.05%。上述变化趋势与单一的 Hb 体系基本相似。Hb 的等电点约为 7.2,

亲和配基 PMB 是一种等电点约在 8~9 之间的弱碱性物质^[26], 所以在 pH 5~7、8 和 9 时, 二者之间的静电作用力依次为同种正电荷静电相斥、异种电荷静电相吸和同种负电荷静电相斥。但 Hb 回收率的变化趋势却与之相反, 表明除了静电作用, 还有疏水等相互作用影响 Hb 和亲和介质间的相互作用。综合考虑内毒素的去除率和蛋白质回收率, 中性条件 (pH 7.0) 最有利于 Hb 溶液中内毒素的去除。

2.3.2 NaCl 浓度的影响

分别考察了不同 NaCl 浓度 (0~1.0 mol/L) 对不同体系 (水溶液和 Hb 溶液) 中内毒素去除的影响 (LPS 浓度为 835.54 EU/mL, Hb 浓度为 0.51785 mg/mL, 缓冲体系为 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 吸附温度为 4℃, 吸附时间为 0.5 h), 同时进行了单一 Hb 体系的实验 (不添加内毒素), 以便考察亲和介质对 Hb 的非特异性吸附, 结果如图 3 所示。

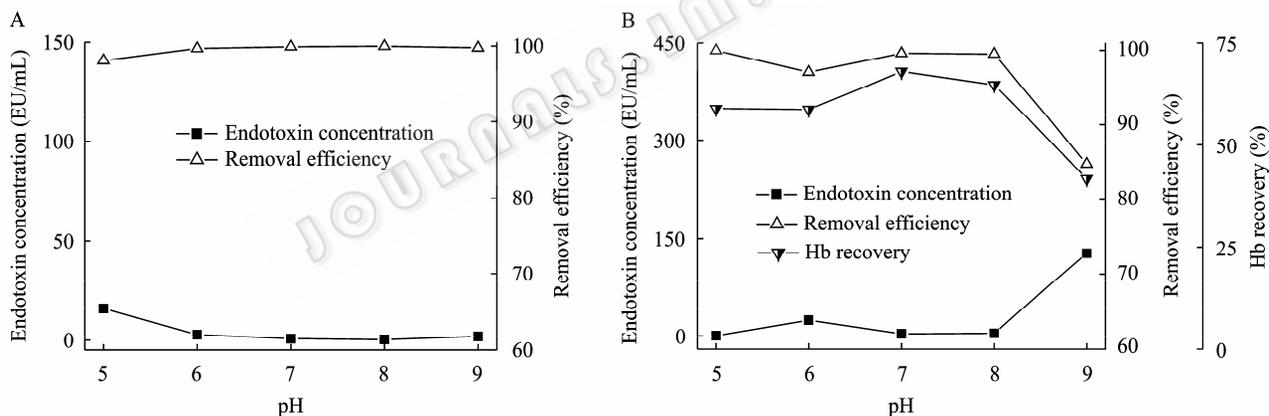


图 2 pH 值对内毒素去除的影响

Fig. 2 Effect of pH on endotoxin removal. (A) Aqueous solution. (B) Hb solution.

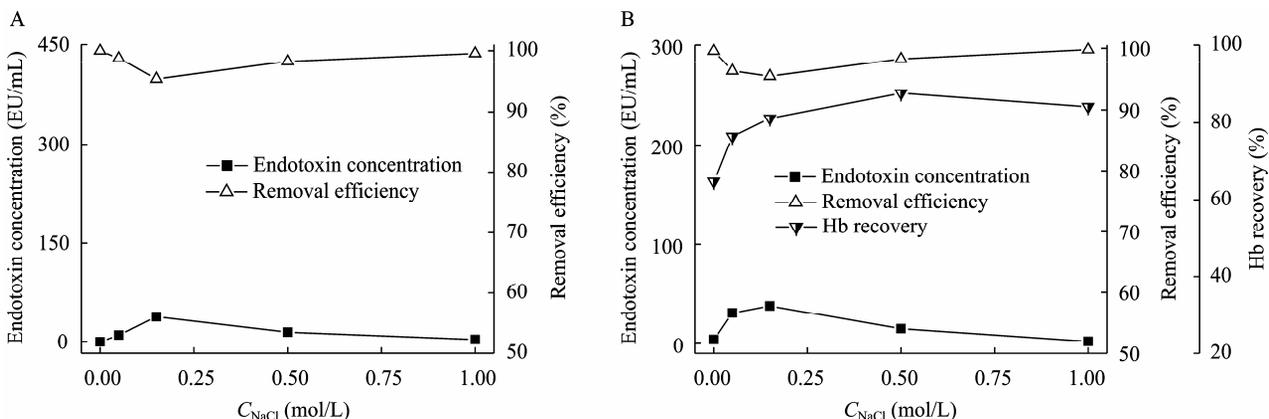


图 3 NaCl 浓度对内毒素去除的影响

Fig. 3 Effect of NaCl concentration on endotoxin removal. (A) Aqueous solution. (B) Hb solution.

对于单一的 LPS 体系, 当 NaCl 浓度从 0 逐步增加到 0.15 mol/L 时, 内毒素去除率从 99.91% 逐步降低到 96.38%, 相应内毒素浓度从 0.22 EU/mL 升高至 38.26 EU/mL; 当 NaCl 浓度继续增加到 1.0 mol/L 时, 内毒素去除率又逐渐升高到 99.55%, 对应的内毒素浓度也降低至 3.75 EU/mL。总之, 低盐浓度 (0 mol/L) 和较高的盐浓度 (0.5~1.0 mol/L) 有利于内毒素的去除。内毒素和亲和配基 PMB 之间的作用主要是疏水作用和静电作用, 而盐浓度 (离子强度) 的变化将导致疏水作用和静电作用同时发生变化, 但其变化趋势是相反的 (增加盐浓度有利于增强疏水作用, 但会削弱静电作用), 二者的协同作用导致了上述变化趋势的出现。对于含 Hb 的内毒素体系, 变化趋势与不含 Hb 的内毒素相似, 内毒素去除率也基本相同。

对于单一的 Hb 体系, 在所考察的 NaCl 浓度范围内, Hb 均有不同程度的损失。随着 NaCl 浓度从 0 逐步升高到 1.0 mol/L, Hb 的回收率逐步增加, 变化趋势与含内毒素的 Hb 体系相似。在 pH 8.0 条件下, Hb 和亲和配基 PMB 之间存在静电相互作用, 导致部分 Hb 吸附到介质上, 引起蛋白的损失。随着 NaCl 浓度的增加, 二者之间的静电作用减弱, 吸附量减少, 回收率增加。理论上, 疏水性蛋白 Hb 和亲和配基 PMB 之间也存在疏水相互作用, 但在所考察的 NaCl 浓度范围内, 疏水作用较弱, 以静电作用为主。

2.3.3 CaCl_2 浓度的影响

鉴于内毒素之间、内毒素和蛋白质之间可能通

过二价阳离子的桥接作用形成复合物, 进而影响内毒素的去除和蛋白质的回收, 分别考察了不同 CaCl_2 浓度 (0~0.2 mol/L) 对不同体系 (水溶液和 Hb 溶液) 中内毒素去除的影响 (LPS 浓度为 417.77 EU/mL, 缓冲体系为 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 吸附温度为 4°C, 吸附时间为 4 h), 结果如图 4 所示。

对于单一的 LPS 体系, 当 CaCl_2 浓度从 0 增加到 0.02 mol/L 时, 内毒素去除率从 99.96% 降低到 94.86%, 对应内毒素含量从 0.15 EU/mL 升高至 21.49 EU/mL; 当 CaCl_2 浓度从 0.02 mol/L 继续增加到 0.2 mol/L 时, 内毒素去除率从 94.86% 又逐渐升高到 99.95%, 内毒素含量也逐渐降低至 0.21 EU/mL 以下。与 NaCl 相比, CaCl_2 的影响机理更为复杂。 CaCl_2 浓度的变化除了通过影响溶液的离子强度来改变内毒素和亲和配基 PMB 之间的疏水作用和静电作用外, 还可通过二价阳离子 Ca^{2+} 的桥接作用促使内毒素分子形成聚集体, 影响内毒素和亲和介质的相互作用。上述三者的协同作用导致如图 4 所示的变化趋势。

对于含 Hb 的内毒素体系, 其去除率的变化趋势与不含 Hb 的内毒素相似, 但去除率略有降低, 说明 Hb 的加入对内毒素的去除产生了一定的负面影响, 原因可能是 Ca^{2+} 的桥接作用促使部分内毒素和 Hb 形成复合物, 不利于内毒素的去除。在相同的离子强度下, 内毒素的去除率与 NaCl 体系 (图 3) 相似 (除 CaCl_2 浓度为 0.02 mol/L)。

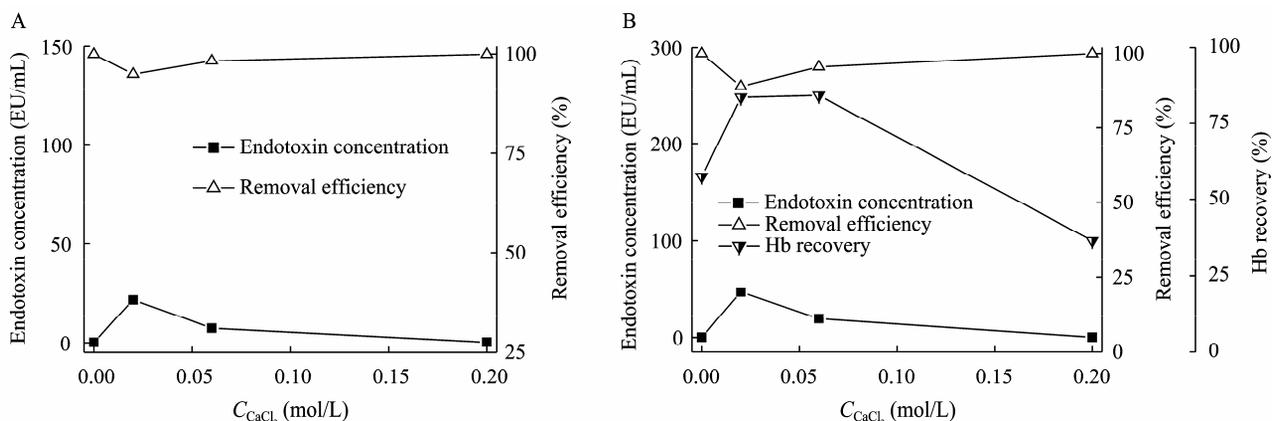


图 4 CaCl_2 浓度对内毒素去除的影响

Fig. 4 Effect of CaCl_2 concentration on endotoxin removal. (A) Aqueous solution. (B) Hb solution.

对于 Hb 体系 (包括含和不含内毒素 2 种体系), 在所考察的 CaCl_2 浓度范围内, Hb 均有不同程度的损失。 CaCl_2 对 Hb 回收率的影响规律与 NaCl 的影响规律相似, 唯一不同的是当 CaCl_2 浓度增加到 0.2 mol/L (离子强度与 0.5 mol/L NaCl 相等) 时, Hb 的回收率急剧下降, 可能原因是 Ca^{2+} 比 Na^+ 更有利于增强 Hb 与亲和介质之间的疏水作用, 导致更多的 Hb 吸附到亲和介质上。

2.3.4 蛋白质种类的影响

采用 PMB 亲和介质去除蛋白质溶液中内毒素的过程中, 蛋白质的疏水性强弱和带电荷情况也会影响蛋白质的非特异性吸附、蛋白质与内毒素之间的相互作用和内毒素的去除效果。为了揭示蛋白质特性的影响规律, 实验进一步考察了不同 CaCl_2 浓度 (0~0.2 mol/L) 对 HSA 和 LYS 体系中内毒素去除的影响, 操作条件同“2.3.3”, 结果如图 5 所示。

对于含 HSA 的内毒素体系, 其去除率随 CaCl_2 浓度增大的变化趋势与含 Hb 的内毒素体系相似, 但内毒素去除率相对较低, 尤其是当 CaCl_2 浓度为 0.02 mol/L 时, 内毒素去除率只有 60.03% (对应内毒素浓度为 166.97 EU/mL), 这是由于 HSA 在 pH 8.0 条件下带有大量负电荷, Ca^{2+} 不仅促使了部分内毒素分子通过桥接作用形成聚集体, 还可促使内毒素和带负电荷的 HSA 通过桥接作用形成内毒素-蛋白复合物, 不利于内毒素的吸附和去除。对于 HSA 体系 (包括含和不含内毒素 2 种体系), 随着 CaCl_2 浓度逐步增加, HSA 回收率先升高后降低, 变化趋势与 Hb 相似。但 HSA 回收率的大小又与 Hb 明显

不同, 不添加 CaCl_2 时, HSA 的回收率只有 3.02%~3.34% (Hb 回收率为 52.40%~57.55%), 这是由于 HSA 等电点在 4.7~4.9, 在 pH 8.0 条件下带有大量负电荷, 与亲和介质之间有更强的静电作用。而随着 CaCl_2 的加入, HSA 的回收率又快速上升到超过 Hb 的水平, 这是由于 HSA 的疏水性小于 Hb, 在同离子强度下, HSA 与亲和介质之间的疏水作用小于 Hb, 故吸附量更小, 回收率更高。

对于 LYS 体系 (包括含和不含内毒素 2 种体系), 随着 CaCl_2 浓度逐步增加, LYS 回收率总体呈上升趋势。与 Hb 和 HSA 相比, LYS 的回收率更高 (78.64%~97.28%), 这是由于 LYS 的疏水性比 Hb 和 HSA 弱, 与亲和介质之间的疏水作用力较弱。此外, LYS 是一种碱性蛋白, 等电点约为 11.0, 所以在 pH 8.0 条件下, LYS 与亲和配基之间存在静电排斥作用, 一定程度上抑制了由疏水作用引起的吸附。LYS 体系的内毒素去除率随 CaCl_2 浓度的变化趋势与 Hb 和 HSA 体系相似, 但去除率略有提高。

从 3 种蛋白体系 (Hb、HSA 和 LYS) 的实验结果可知, 去除内毒素的亲和介质和蛋白质之间均存在或多或少的静电作用和疏水作用, 引起蛋白质在亲和介质上的吸附并导致蛋白回收率的降低。其中蛋白质自身的等电点和疏水性对其在亲和介质上的吸附影响最大, 碱性蛋白和弱疏水性蛋白 (如 LYS) 与亲和介质的相互作用最弱, 吸附最少, 回收率最高。此外, 溶液的离子强度 (盐浓度) 对蛋白质和亲和介质之间的疏水和静电作用的影响是相反的, 增加离子强度有利于增强疏水作用, 但却会抑制静电

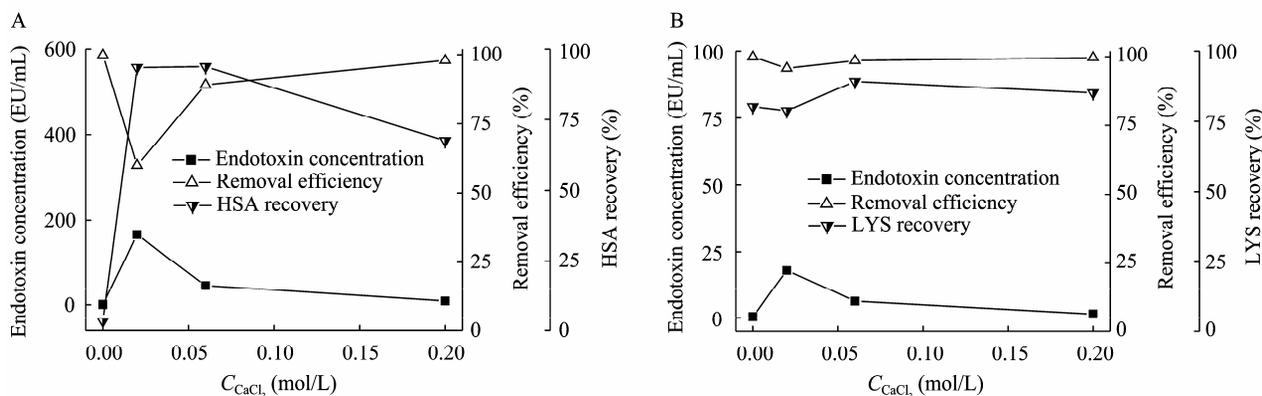


图 5 CaCl_2 浓度对蛋白质溶液中内毒素去除的影响

Fig. 5 Effect of CaCl_2 concentration on endotoxin removal of protein solutions. (A) HSA solution. (B) LYS solution.

作用, 所以随着盐浓度的增加, 蛋白质的回收率呈先升高后下降的变化趋势 (弱疏水性蛋白 LYS 除外)。理论上, 还可根据蛋白质等电点选择合适的 pH 条件, 以改变蛋白质的带电性质 (正、负电荷) 及电荷多少, 进而调控蛋白质与亲和介质间的静电作用, 减少蛋白质在介质上的吸附 (图 2)。实际应用中, 应根据蛋白的疏水性和等电点, 并综合考虑 pH 和盐浓度对内毒素去除和蛋白回收的影响, 选择合适的 pH 和盐浓度条件, 在确保高内毒素去除率的前提下最大限度地提高蛋白的回收率。

2.4 其他因素对水溶液中内毒素去除的影响

除了上述主要影响因素外, 其他操作条件如温度、时间、内毒素初始浓度、蛋白质浓度、添加剂及介质使用次数也会对内毒素的去除产生一定影响。因此实验以水溶液为对象, 又进行了这些因素的考察。

2.4.1 温度的影响

分别考察了 3 种温度 (4℃、25℃、37℃) 下, 内毒素的去除效果 (LPS 浓度为 835.54 EU/mL, 缓冲体系为 20 mmol/L PB+0.15 mol/L NaCl, pH 7.0, 吸附时间为 10 min), 结果如图 6 所示。随着温度的升高, 内毒素去除率逐渐升高, 这是由于升温有利于加快内毒素分子的布朗运动^[22], 也有利于增强内毒素与亲和介质间的疏水作用^[20], 促进内毒素在介质上的吸附。在所考察的温度范围内, 内毒素去除率均能达到 99% 以上的水平 (对应内毒素含量均在 3.25 EU/mL 以下), 高于文献报道的 87%~99% 的水平^[22]。鉴于低温 (4℃) 通常有利于蛋白稳定性的保

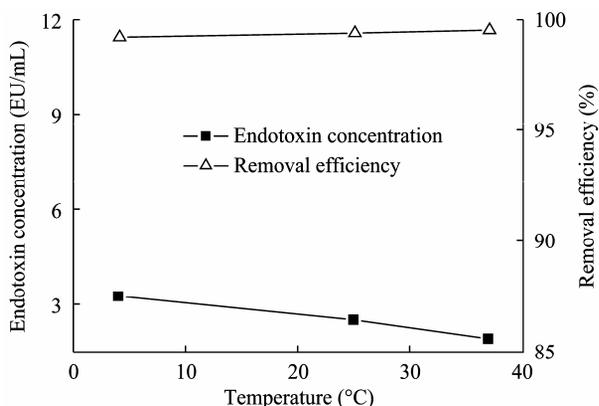


图 6 温度对内毒素去除的影响

Fig. 6 Effect of temperature on endotoxin removal.

持, 同时也能取得很好的内毒素去除效果, 因此可在低温条件下进行蛋白质溶液中内毒素的去除操作, 以便于提高蛋白的稳定性和回收率。

2.4.2 时间的影响

分别考察了不同吸附时间 (2 min~24 h) 下, 内毒素的去除效果 (LPS 浓度为 417.77 EU/mL, 缓冲体系为 20 mmol/L PB+0.15 mol/L NaCl, pH 7.0, 吸附温度为 4℃), 结果如图 7 所示。吸附时间越长, 内毒素去除率越高。吸附作用不仅发生在介质的外表面, 还发生在介质内部孔道的表面, 吸附时间越长, 内毒素在介质内部孔道的扩散越充分, 吸附越彻底, 去除率越高。当吸附时间达到 15 min, 内毒素含量即可降至 1 EU/mL 以下; 当吸附时间达到 4 h, 内毒素含量即可降至 0.1 EU/mL 以下。

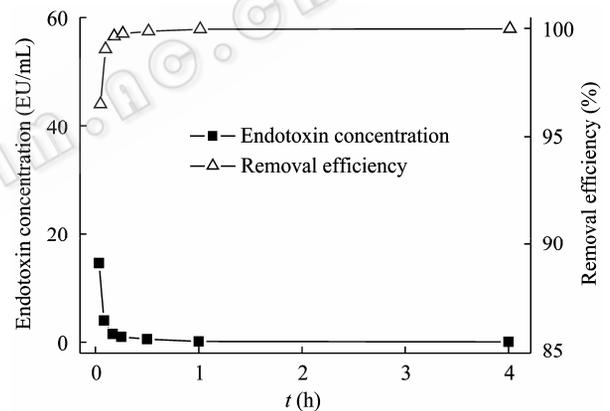


图 7 吸附时间对内毒素去除的影响

Fig. 7 Effect of time on endotoxin removal.

2.4.3 内毒素浓度的影响

分别考察了不同内毒素浓度 (8.3554~41 777.0 EU/mL) 对内毒素去除的影响 (缓冲体系为 20 mmol/L PB+0.15 mol/L NaCl, pH 7.0, 吸附温度为 4℃, 吸附时间为 4 h), 结果如图 8 所示。随着初始内毒素浓度逐渐增加, 吸附后内毒素浓度也逐渐增大, 且去除率略有下降, 但变化不大, 均在 99.4% 以上, 当初始内毒素浓度为 4 177.7 EU/mL 时, 吸附后内毒素浓度为 5.7 EU/mL, 而当初始内毒素浓度为 1 671.08 EU/mL 时, 吸附后内毒素浓度可降为 0.47 EU/mL, 对应去除率分别为 99.86% 和 99.77%。由此可见, 在去除率不低于 99% 的情况下, PMB QZT FF 亲和介质的载量可达到 600 000 EU LPS/mL

介质的水平 (1 g 抽干的胶相当于 1.4 mL), 实际应用中可根据要求适当调整吸附量以使最终内毒素残留量达标。

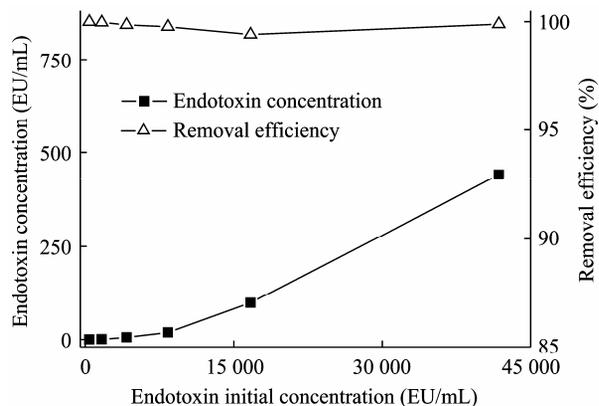


图 8 初始内毒素浓度对内毒素去除的影响
Fig. 8 Effect of endotoxin initial concentration on endotoxin removal.

2.4.4 蛋白质浓度的影响

以 Hb 为模型蛋白, 考察了不同 Hb 浓度 (0~2.0 mg/mL) 对内毒素去除及蛋白回收的影响 (LPS 浓度为 417.77 EU/mL, 缓冲体系为 20 mmol/L PB+0.15 mol/L NaCl, pH 7.0, 吸附温度为 4°C, 吸附时间为 4 h), 结果如图 9 所示。随着体系中 Hb 浓度的逐渐增大, 内毒素的去除率出现轻微的下降, 但变化幅度很小, 去除率均在 99.8% 以上 (内毒素浓度均在 0.70 EU/mL 以下)。根据文献报道^[27], Hb 和内毒素之间存在相互作用, Hb 的加入可促使内毒素聚集体解聚成单体, 并与 Hb 形成内毒素-Hb 复合物, 而复合物和亲和介质之间的作用力弱于内毒素, 相对不易被吸附。随着 Hb 浓度的升高, 内毒素-Hb 复合物有所增加, 故内毒素去除率会降低, 但形成内毒素-Hb 复合物的内毒素只占很小的比率, 所以其去除率只有轻微下降。此外, 吸附后 Hb 有不同程度的损失, 表明亲和介质对 Hb 有一定的吸附 (疏水作用和静电作用)。随着 Hb 浓度的增加, Hb 吸附到介质上的量 (绝对量) 逐步增加, 但回收率 (相对量) 也逐步增加。

2.4.5 添加剂的影响

内毒素在溶液中容易形成分子量高达 40 万至 100 万不等的聚集体、胶束或胶囊^[4], 而表面活性剂

如 Triton、脱氧胆酸钠 (DOS) 及螯合剂 EDTA 等, 可将内毒素聚集体解聚为单体, 也可打开内毒素-蛋白质复合物^[28]。相关研究表明在内毒素的去除过程中加入上述添加剂, 可以提高内毒素的去除效果^[11-13,29], 但添加剂的后续去除是一个问题。此外, 添加剂是否会干扰内毒素的检测, 造成实验结果的失真也未见相关报道。

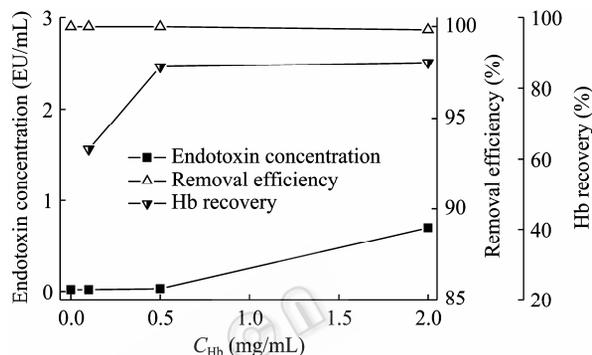


图 9 Hb 浓度对内毒素去除的影响
Fig. 9 Effect of Hb concentration on endotoxin removal.

本实验首先考察了 5 种添加剂对内毒素检测的影响, 结果如表 3 所示。添加剂对内毒素检测的干扰极大, 其中尿素和 EDTA 导致检测结果偏高 0.26 和 0.67 倍, 而 SDS、DOS 和 Triton X-100 导致检测值降低至原来的 0.06%、0.53% 和 0.96%。随后考察了添加剂对内毒素去除的影响, 结果表明在所考察的浓度条件下, 尿素和 EDTA 的加入导致内毒素去除率出现轻微的下降 (将添加剂对内毒素测定的干扰计算在内, 下同); DOS 的加入导致内毒素去除率出现显著的下降; 而 SDS 和 Triton X-100 的影响尚不清楚。

表 3 添加剂对内毒素检测的影响

Table 3 Effect of additives on endotoxin assay

Additive (0.25%)	Endotoxin concentration ⁿ (EU/mL)	Endotoxin concentration (EU/mL)
SDS		2.61
DOS		22.25
Triton X-100	4 177.7	40.26
EDTA		6 994.35
Urea		5 260.77

n: representative the endotoxin concentration without additives.

表 4 添加剂对内毒素去除效果的影响

Table 4 Effect of additives on endotoxin removal

Additive (0.25%)	Endotoxin concentration (EU/mL)	Removal efficiency (%)
-	5.7	99.86
SDS	<2.22	99.95
DOS	33.83	99.19
Triton X-100	<0.22	99.99
EDTA	18.68	99.55
Urea	10.11	99.76

2.4.6 介质使用次数的影响

考察了介质使用次数对内毒素去除的影响 (LPS 浓度为 417.77 EU/mL, 缓冲体系为 20 mmol/L PB+0.15 mol/L NaCl, pH 7.0, 吸附温度为 4℃, 吸附时间为 1 h), 结果如图 10 所示。随着介质使用次数的增加, 内毒素的去除率只有轻微的下降, 但第 3 次使用时仍能达到 99.66% 的内毒素去除率, 内毒素残留量低至 1.40 EU/mL, 可以满足实际应用的需要。

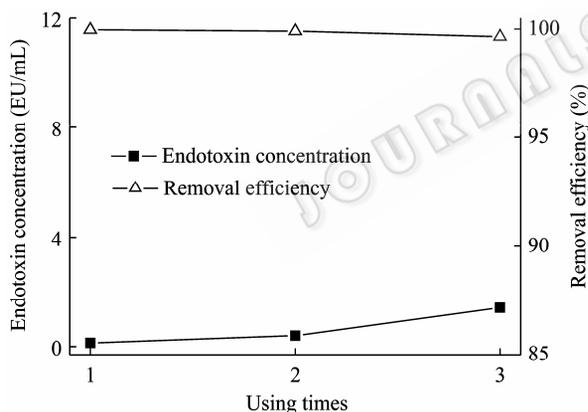


图 10 介质使用次数对内毒素去除的影响

Fig. 10 Effect of using times on endotoxin removal.

3 结论

本研究采用合成的 PMB QZT FF 亲和介质对不同蛋白质溶液中的内毒素进行去除, 重点考察了亲和介质 (间隔臂长度和配基密度)、溶液条件 (pH 值、NaCl 浓度、CaCl₂ 浓度) 和蛋白特性 (等电点和疏水性) 对内毒素去除率和蛋白回收率的影响, 探讨了各种影响因素的作用机制, 得出了如下结论:

1) PMB QZT FF 亲和介质具有载量大 (600 000 EU LPS/mL 介质)、吸附速度快 (5~10 min)、

去除率高 (99% 以上)、可重复使用的特点。

2) 在 pH 5~9 的范围内, 内毒素去除率均保持在 98% 以上, 其中中性和弱碱性条件 (pH 7~8) 更有利于内毒素的去除 (99.9% 以上); pH 通过改变蛋白的带电性质影响蛋白与亲和介质间的静电作用, 从而影响蛋白的回收率, 因此, pH 的选择对蛋白的有效回收极为关键。

3) 盐浓度的改变导致内毒素与亲和介质、蛋白与亲和介质之间的静电作用和疏水作用同时发生变化, 随着盐浓度的增加, 两种因素的协同作用使内毒素去除率呈先下降后上升的趋势, 蛋白回收率呈先上升后下降的趋势, 表明内毒素及蛋白与亲和介质之间的作用力均以静电作用为主, 疏水等相互作用为辅; 在同等离子强度下, NaCl 和 CaCl₂ 两种盐对内毒素去除率和蛋白回收率的影响基本相似。

4) 蛋白等电点的高低和疏水性的强弱是决定蛋白回收率高低的主要因素, 其中弱疏水性蛋白和碱性蛋白在亲和介质上的吸附更少, 回收率更高; 可根据蛋白的等电点和疏水性调节溶液条件 (pH 值、盐浓度) 来提高蛋白的回收率。

5) 蛋白质的加入导致内毒素去除率的轻微下降, 表明内毒素和蛋白质之间具有一定的相互作用 (如形成内毒素-蛋白复合物), 影响内毒素的去除。

6) 添加剂对内毒素检测的干扰极大, 其对内毒素去除的影响还有待于进一步研究。

REFERENCES

- [1] Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microb Infect*, 2002, **4**: 837-851.
- [2] Daneshian M, Guenther A, Wendel A, *et al.* *In vitro* pyrogen test for toxic or immunological drugs. *J Immunol Methods*, 2006, **313**: 169-175.
- [3] United States Pharmacopoeia-National Formulary. USP 30-NF 25. United States Pharmacopoeial Convention, 2007.
- [4] Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol*, 2000, **76**: 97-119.
- [5] Liu S, Tobias R, McClure S, *et al.* Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clin Biochem*, 1997, **30**: 455-463.
- [6] Schädlich L, Senger T, Kirschning CJ, *et al.* Refining HPV

- 16 L1 purification from *E. coli*: reducing endotoxin contaminations and their impact on immunogenicity. *Vaccine*, 2009, **27**: 1511–1522.
- [7] Li L, Luo RG. Use of Ca^{2+} to aggregate lipopolysaccharides (LPS) in hemoglobin solutions and the subsequent removal of endotoxin by ultrafiltration. *Biotechnol Tech*, 1998, **12**: 119–122.
- [8] Pyo SH, Lee JH, Park HB, *et al.* A large-scale purification of recombinant histone H1.5 from *Escherichia coli*. *Protein Exp Purif*, 2001, **23**: 38–44.
- [9] Fiske MJ, Fredenburg RA, VanDerMeid KR, *et al.* Method for reducing endotoxin in *Moraxella catarrhalis* UspA2 protein preparations. *J Chromatogr B*, 2001, **753**: 269–278.
- [10] Xu XR, Ma GC, Wang CM, *et al.* Removing endotoxin from rHSA-IFNa2b by chromatography. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(1): 159–163.
徐向荣, 马国昌, 王昌梅, 等. 层析法去除重组人血清白蛋白干扰素 $\alpha 2b$ 融合蛋白的内毒素. *生物工程学报*, 2008, **24**(1): 159–163.
- [11] Pi WH, Sun CJ, Song ZQ, *et al.* Purification of plasmid DNA using anion-exchange chromatography and removal of endotoxin with Triton X-114 or Triton X-100. *Chin J Chromatogr*, 2007, **25**: 809–813.
- [12] Chen RH, Huang CJ, Newton BS, *et al.* Factors affecting endotoxin removal from recombinant therapeutic proteins by anion exchange chromatography. *Protein Exp Purif*, 2009, **64**: 76–81.
- [13] Wilson MJ, Haggart CL, Gallagher SP, *et al.* Removal of tightly bound endotoxin from biological products. *J Biotechnol*, 2001, **88**: 67–75.
- [14] Freitas SS, Santos JAL, Prazeres DMF. Plasmid purification by hydrophobic interaction chromatography using sodium citrate in the mobile phase. *Sep Purif Technol*, 2009, **65**: 95–104.
- [15] Anspach FB. Endotoxin removal by affinity sorbents. *J Biochem Bioph Methods*, 2001, **49**: 665–681.
- [16] Magalhães PO, Lopes AM, Mazzola PG, *et al.* Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J Pharm Sci*, 2007, **10**: 388–404.
- [17] Anspach FB, Hilbeck O. Removal of endotoxins by affinity sorbents. *J Chromatogr A*, 1995, **711**: 81–92.
- [18] Montbriand PM, Malone RW. Improved method for the removal of endotoxin from DNA. *J Biotechnol*, 1996, **44**: 43–46.
- [19] Issekutz AC. Removal of gram-negative endotoxin from solutions by affinity chromatography. *Immunol Methods*, 1983, **61**: 275–281.
- [20] Tang SW, Kong L, Ou JJ, *et al.* Study on endotoxin removal by affinity chromatography. *Chin J Ana Chem*, 2006, **34**(4): 455–458.
唐守万, 孔亮, 欧俊杰, 等. 柱亲和介质用于内毒素去除的研究. *分析化学*, 2006, **34**(4): 455–458.
- [21] Lahiri VL, Srivastava RK, Hazra DK, *et al.* Removal of endotoxin from antibody preparations for clinical use. *Cell Biophysics*, 1994, **24**(25): 9–14.
- [22] Yu HH, Nakase I, Pujals SP, *et al.* Expressed protein ligation for the preparation of fusion proteins with cell penetrating peptides for endotoxin removal and intracellular delivery. *Biochim Biophys Acta*, 2010, doi: 10.1016/j.bbamem.2010.02.003.
- [23] Ellass-Rochard E, Roseanu A, Legrand D, *et al.* Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* O55B5 lipopolysaccharide. *J Biochem*, 1995, **312**(3): 839–845.
- [24] Wieslaw K, Robert IR, Jack L. Hemoglobin, a newly recognized lipopolysaccharide (LPS)-binding protein that enhances LPS biological activity. *J Biol Chem*, 1994, **269**(40): 25078–25084.
- [25] Nation Pharmacopeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (3rd Part). Beijing: Chemical Industry Publishing Company, 2005.
国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(第三部). 北京: 化工出版集团, 2005.
- [26] Hirayama CC, Masayo S. Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles. *J Biol Chem*, 2002, **781**: 419–432.
- [27] Li LP, Luo RG. Protein concentration effect on protein-lipopolysaccharide (LPS) binding and endotoxin removal. *Biotechnol Lett*, 1997, **19**(2): 135–138.
- [28] Hirayama CC, Masayo S. Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles. *J Biol Chem*, 2002, **781**: 419–432.
- [29] Jang HJ, Kim HS, Moon SC, *et al.* Effects of protein concentration and detergent on endotoxin reduction by ultrafiltration. *BMB Reports*, 2009, **42**(7): 462–466.